

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUAN SALLES PASSOS

**BIOLOGIA REPRODUTIVA E DA POLINIZAÇÃO DE *Behuria insignis*  
(MELASTOMATACEAE), UMA ESPÉCIE ENDÊMICA DE REGIÕES  
ALTOMONTANAS NO LITORAL DO PARANÁ, BRASIL**

CURITIBA

2017

LUAN SALLES PASSOS

**BIOLOGIA REPRODUTIVA E DA POLINIZAÇÃO DE *Behuria insignis*  
(MELASTOMATACEAE), UMA ESPÉCIE ENDÊMICA DE REGIÕES  
ALTOMONTANAS NO LITORAL DO PARANÁ, BRASIL**

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas, Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Profº Drº Renato Goldenberg  
Coorientador: Drº Fabiano Rodrigo da Maia

CURITIBA

2017

## RESUMO

Estudos envolvendo biologia reprodutiva e polinização foram essenciais para elucidar questões diversas na área biológica, como a ecologia e evolução. Diversos fatores, sejam eles bióticos ou abióticos, são capazes de afetar o sistema reprodutivo de uma espécie vegetal, interferindo diretamente na sua capacidade de colonização e estabelecimento em uma determinada área. Melastomataceae é uma família de plantas pantropicais com grande diversidade em sistemas reprodutivos. O intuito deste trabalho foi investigar a biologia reprodutiva de *Behuria insignis*, com o objetivo de descrever como o sistema reprodutivo associado à ação dos visitantes florais pode interferir no estabelecimento da espécie em regiões isoladas. Essa espécie arbustiva é endêmica de regiões altomontanas da Mata Atlântica. Apresenta inflorescências tirsóides de flores apicais, hexâmeras, diplostêmones, pétalas brancas e anteras amarelas com apêndices dorsais filiformes. O estudo foi realizado através de trabalhos em campo durante o mês de fevereiro de 2016, em Antonina, Paraná. Foram analisados aspectos da biologia floral dessa melastomatácea. O sistema reprodutivo foi avaliado através de polinizações controladas: Polinização Cruzada Manual (PC), Autopolinização Manual (AM), Autopolinização Espontânea (AE), Apomixia (AX) e Controle (C). Os frutos provenientes destes testes foram acompanhados por um mês até a maturação dos frutos. O *fitness* da prole foi avaliado pela contagem e proporção de sementes germinadas, provenientes dos frutos formados em cada tratamento. Os visitantes florais foram observados durante 30h e capturados para identificação. A flor tem duração de um dia com período de antese que se inicia próximo às 5h, com o estigma já receptivo, e se prolonga até próximo às 16h, quando inicia a senescência. O pólen foi o único recurso ofertado aos visitantes, extraído pela vibração das anteras (*Buzz-pollination*) por abelhas que apresentam capacidade vibrátil, ou ainda por abelhas que mastigam as mesmas. A viabilidade polínica é de  $96\% \pm 1,23$  dos grãos de pólen viáveis. Foi constatada maior formação de frutos no tratamento PC (72%), seguido por C (50%) e menor taxa em AM (37,5%). Os tratamentos AX e AE não formaram frutos. A taxa média na formação de sementes por fruto também foi maior nos tratamentos PC ( $323,1 \pm 47,04$ ) e C ( $291,1 \pm 28,96$ ) e menor quantidade em AM ( $257,9 \pm 64,36$ ). *Behuria insignis* é autocompatível (ISI = 0,52) com baixa limitação polínica e dependente de polinizadores para a ocorrência do fluxo polínico. O sistema de reprodução autocompatível associado à efetividade dos polinizadores de *B. insignis* garantiu à espécie a capacidade de se estabelecer e manter uma população viável em um ambiente isolado, demonstrando a importância dos processos evolutivos e coevolutivos (interação planta-polinizador) na reprodução da espécie.

## ABSTRACT

Studies involving reproductive biology and pollination had been essential to elucidate several questions in biology, such as ecology and evolution. Biotic and abiotic factors are capable to affect the reproductive system of a vegetal species, interfering directly in its capacity to colonize and to establish populations in an area. Melastomataceae is a pantropical plant family with a great diversity in reproductive systems. The aim our study was to investigate the reproductive biology of *Behuria insignis*, with the purpose to describe how its reproductive system is associated to the floral visitors activity and how both can influence the establishment of the species in isolated regions. *B. insignis* is a shrub that is endemic to high altitude areas in Atlantic Forest. It presents apical inflorescences, hexamerous, diplostemonous, flowers with white petals and yellow stamens, these with filiform dorsal appendages. Field work was carried out during February 2016, in Antonina, Paraná. Several aspects related to floral biology had been analyzed. The reproductive system was evaluated through controlled pollinations: cross-pollination (PC), hand self-pollination (AM), spontaneous self-pollination (AE), apomixis (AX) and open-pollination (C). The fruits from these tests were followed for one month until the formation of mature fruits. The offspring fitness was evaluated through seed counting and germination tests from the fruits formed in each treatment. The floral visitors had been observed during 30h and captured for identification. The flower lasts one day, with anthesis beginning at 5h, when the stigma is already receptive, and finishing at 16h, when the senescence process starts. The pollen was the only resource offered to visitors, extracted from the vibration of anthers (Buzz-pollination) by bees with vibrating capacity, or by some bees that chew the anthers. Pollen viability is  $96\% \pm 1,23$ . The higher fruit set was found for PC (72%), followed by C (50%) and lower taxes in AM (37.5%). Treatments AX and AE did not produce fruits. The average seed set was higher in PC ( $323,1 \pm 47,04$ ) and C ( $291,1 \pm 28,96$ ), and smaller in AM ( $257,9 \pm 64,36$ ). *Behuria insignis* is self-compatible (ISI = 0,52) and the population that was studied did not show pollen limitation. It's dependent on pollinators activity in order to reproduce. The self-compatible breeding system associated to the effectiveness of pollinators of *Behuria insignis* guaranteed its capacity to establish and maintain a viable population in an isolated environment, demonstrating the importance of evolutionary and coevolutionary processes (interaction plant-pollinator) in the reproduction of the species.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>5</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>8</b>
Espécie alvo.....	8
Área de estudo.....	9
Biologia Floral.....	10
Sistema reprodutivo.....	11
Visitantes florais.....	12
Análise de dados.....	13
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>13</b>
Biologia Floral.....	13
Sistema reprodutivo.....	14
Visitantes florais.....	16
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>25</b>
<b>FIGURAS.....</b>	<b>26</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>27</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos envolvendo biologia reprodutiva em plantas e biologia da polinização foram fundamentais para elucidar questões envolvendo ecologia e evolução. Como exemplo, há os estudos clássicos de Gregor Mendel, considerado o pai da Genética, e Darwin, que, convergindo com postulados de Alfred Russel Wallace, desenvolveu a Teoria da Evolução (RECH & WESTERKAMP, 2014). Estudos envolvendo essa temática também têm impactos positivos no desenvolvimento de melhores resultados na produção de vegetais utilizados para fins alimentícios, farmacêuticos e em atividades socioculturais distintas.

As angiospermas (plantas com flores), diferentes da grande maioria das espécies animais, apresentam em geral, sistemas de reprodução mistos, raramente são encontradas plantas com sistemas únicos de reprodução. Um exemplo disso são espécies autoincompatíveis – plantas que não formam sementes ao serem fecundadas por seu próprio pólen (CLARK & KAO, 2004), ou outras que apresentam formas de reprodução clonal (VALLEJO-MARÍN & O'BRIEN, 2007). As angiospermas vêm apresentando, ao longo de sua história evolutiva, diferentes adaptações em suas formas de reprodução, seja ela sexuada ou assexuada (KARASAWA *et al.*, 2009).

Diversos são os fatores que, somados, exercem influência na capacidade reprodutiva de uma espécie vegetal. Esses fatores podem apresentar caráter abiótico (clima e distribuição espaço-temporal de uma respectiva espécie, por exemplo), ou caráter bióticos, como frequência de polinizadores e características intrínsecas das espécies (RENNER, 1989; GOLDENBERG & VARASSIN, 2001; FRACASSO & SAZIMA, 2004; BRITO *et al.*, 2012; MAIA *et al.*, 2016; MAIA, 2017).

A biologia reprodutiva de uma planta afeta diretamente seu sucesso reprodutivo, gerando conseqüências importantes para a viabilidade de suas populações (RYMER *et al.*, 2005; EVANS *et al.*, 2003). Nesse contexto, o entendimento dos processos que envolvem a polinização torna-se fundamental, pois fornece informações úteis para entendermos a evolução dos sistemas

reprodutivos das espécies vegetais, bem como detectar barreiras reprodutivas, fixação ou perda de alelos em populações mediada por polinizadores, capacidade de colonização e dispersão das plantas, processos microevolutivos dentro de táxons específicos e auxiliar no entendimento da estruturação e dinâmica das populações numa escala espaço-temporal (HAMRICK & GODT, 1996; GOLDENBERG & SHEPHERD, 1998; SANTOS *et al.*, 2012; BRITO *et al.*, 2012; MAIA *et al.*, 2016; MAIA *et al.*, 2017).

A Família Melastomataceae está incluída na Ordem Myrtales, sendo representada por espécies vegetais de hábitos diversos (herbáceas, arbustivas, arbóreas e lianas). Essa diversidade de hábitos permitiu à família ampla distribuição em várias formações vegetacionais distribuídas nas porções tropicais e subtropicais do planeta (CLAUSING & RENNER, 2001). É a sexta maior família de Angiospermas no Brasil, com cerca de 4570 espécies em 150~160 gêneros (GOLDENBERG *et al.*, 2012).

Estudos envolvendo sistemas reprodutivos e polinização em Melastomataceae foram realizados em mais de 150 espécies (RENNER, 1989; GUIMARÃES & RANGA, 1993; GROSS, 1993; MELO & MACHADO, 1996; GOLDENBERG & SHEPHERD, 1998; MELO & MACHADO, 1998; GOLDENBERG & VARASSIN, 2001; FRACASSO & SAZIMA, 2004; SANTOS *et al.* 2012; MAIA *et al.*, 2013; 2016), constatando populações com sistemas reprodutivos autocompatíveis, graus variados de autoincompatibilidade e espécies apomíticas em diferentes clados da família (SANTOS *et al.* 2012).

Muitas espécies de Melastomataceae são caracterizadas por apresentarem flores hermafroditas de anteras tubulosas com deiscência poricida e apenas pólen como recurso aos visitantes florais, indicando polinização realizada por abelhas com capacidade vibrátil, fatores que caracterizam o sistema de polinização por vibração (RENNER, 1989), ou “*buzz-pollination*” (BUCHMANN, 1983). As abelhas capazes de vibrarem as anteras “abraçam-nas” - todas, poucas ou apenas uma antera, dependendo do tamanho do indivíduo - com suas pernas, vibrando a musculatura torácica e fazendo com que as anteras entrem em ressonância, energizando o pólen que, por sua vez, é liberado e adere ao corpo geralmente piloso das abelhas; este pólen pode ser armazenado posteriormente nas escopas ou corbículas das

abelhas (BUCHMANN, 1983). Há também espécies de Melastomataceae que produzem néctar, atraindo polinizadores de diversos grupos taxonômicos, como: moscas, vespas, aves, morcegos e pequenos roedores (LUMER, 1980; LUMER; ALMEDA, 2000; RENNER, 1989; MUCHHALA & JARRIN, 2002; VARASSIN *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2010).

O gênero *Behuria* Cham. abrange 17 espécies (TAVARES, 2005; BAUMGRATZ & CHIAVEGATTO, 2015; MEYER *et al.*, 2012, BOCHORNY *et al.*, 2017), sendo exclusivo do território brasileiro e ocorrente em áreas de Mata Atlântica. O grupo está relacionado com os gêneros *Dolichoura* Brade, *Huberia* DC. e *Merianthera* Kuhl, considerados gêneros médios a pequenos e endêmicos da região leste do território brasileiro (GOLDENBERG *et al.*, 2016). *Behuria insignis* Cham. é a única espécie registrada para o estado do Paraná, com distribuição restrita, e ocorrente em regiões altomontanas na Serra do Mar (GOLDENBERG *et al.*, 2016), com indivíduos distribuídos esparsamente em refúgios vegetacionais de encostas (Figura 1).

A espécie apresenta flores hermafroditas com pétalas alvas e androceu amarelo. Suas anteras são tubulares, relativamente longas, liberando o pólen por um único poro. Tais características indicam que essa planta é polinizada por abelhas especialistas, ou seja, com capacidade vibrátil. No entanto, não há informação sobre estes aspectos da história de vida desta espécie, bem como de todo o gênero. Não há, tampouco, informação sobre aspectos reprodutivos em nenhum dos três gêneros mais proximamente relacionados. Uma característica comum entre *Behuria* e estes gêneros relacionados é a presença de apêndices dorso-basais nos conectivos de seus estames (Goldenberg *et al.* 2012); estes apêndices assumem formas distintas entre estes gêneros, e não se sabe qual é o seu papel no processo de polinização das espécies destes gêneros.

No presente trabalho foi investigada a biologia reprodutiva e da polinização em uma população de *B. insignis* ocorrente no conjunto de montanhas pertencentes ao Pico Paraná, situado no município de Antonina, litoral paranaense, sul do Brasil. Os objetivos específicos para este trabalho foram: (1) descrever a biologia floral de *Behuria insignis*; (2) Descrever o sistema reprodutivo desta população de *Behuria insignis*; (3) Estudar o

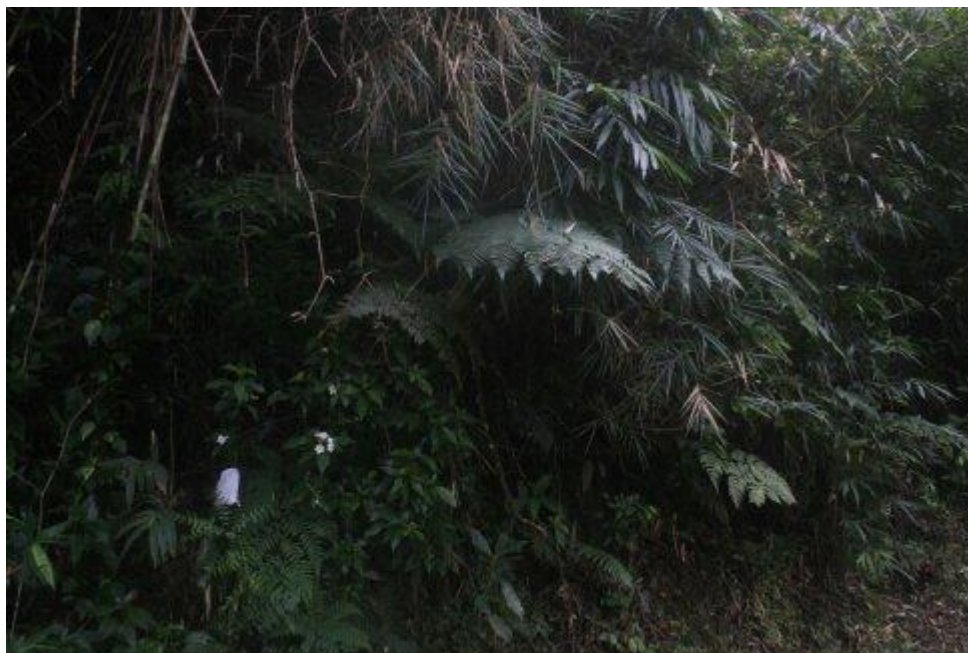


comportamento dos visitantes florais e a implicação disto para o sistema reprodutivo encontrado. Dado que esta espécie ocorre em ambientes isolados em alto de montanhas, nossa hipótese é que *Behuria insignis* seja uma espécie autocompatível (sendo uma característica que garantiria o sucesso reprodutivo da espécie nesse ambiente) com dependência de polinizadores devido suas características florais.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### Espécie alvo

*Behuria insignis* CHAM. apresenta hábito arbustivo, com alguns indivíduos chegando a atingir 3 m de altura. Possui folhas lanceoladas de base aguda, ápice acuminado e margem ciliada. As inflorescências tirsóides apresentam flores apicais, hexâmeras e diplostêmones (Figura 2A). A corola é branca e os estames amarelos. As anteras apresentam apêndices dorsais filiformes com, aproximadamente, metade do tamanho das anteras (2,5 mm e 4,5 mm, respectivamente). Ainda não se sabe a funcionalidade desses apêndices, o que merece ser investigado. Os frutos de *B. insignis* são capsulares. É a única espécie do gênero para o Paraná, apresentando até o presente momento registro de apenas uma população para o estado. (GOLDENBERG *et al.*, 2016).



**FIGURA 1.** Ambiente de ocorrência de *Behuria insignis*.

### **Área de estudo**

O presente estudo foi desenvolvido na APA do Pico Paraná, no município de Antonina, Paraná. A área está localizada na propriedade da Usina Hidrelétrica Governador Viriato Parigot de Souza (UHE), anteriormente denominada Capivari-Cachoeira, gerenciada pela Companhia Paranaense de Energia Elétrica (Copel). A APA que engloba a área de estudo situa-se no Primeiro Planalto do estado do Paraná, na região da Serra do Mar (Figura 3). Está inserida no conjunto de montanhas conhecido por Serra do Ibitiraquire, sendo o Pico Paraná o ponto mais elevado do sul do Brasil, com 1887 m acima do nível do mar. Conforme Veloso e colaboradores (1991), a vegetação dessa área pode ser classificada como Floresta Ombrófila Densa Montana em transição para Altomontana. O clima das florestas altomontanas da Serra do Mar paranaense, em altitudes de 800 a 1000 m, é o Cfb, (subtropical, sempre úmido sendo a temperatura média do mês mais frio abaixo de entre 18 °C e –3 °C e sendo a média do mês mais quente inferior a 22 °C; RODERJAN, 1994). Devido a influência dos alísios SE e ação das chuvas orográficas de ascensão na face oceânica da serra, o nível de precipitação apresenta grandes variações entre as médias anuais (MAACK, 1981). As precipitações podem variar de 2.000 a 3000 mm, caracterizando a região como a mais chuvosa do estado

(IAPAR, 1978). Os meses mais úmidos são dezembro, janeiro e fevereiro; com menor incidência de chuvas nos meses de junho, julho e agosto.



**FIGURA 3.** Mapa com destaque da localização da UHE, área de ocorrência de *B. insignis*, no município de Antonina, Paraná, Brasil. Fonte: O autor.

### Biologia floral

Foram realizadas observações em campo, considerando os aspectos da biologia floral de *Behuria insignis*. Foi analisado o tipo de floração da espécie, a disposição e a morfologia das flores (disposição dos verticilos de reprodução e cores das estruturas), bem como detalhes sobre a duração da antese, pós-antese e senescência das flores. A receptividade do estigma foi avaliada através de técnicas de coloração do citoplasma pelo teste com peróxido de hidrogênio (Reação a esterase - KEARNS & INOUE, 1993). Foi verificada a presença de osmóforos pelo teste do vermelho-neutro (VOGEL, 1962) ou outras formas de atrativos florais, bem como a presença de recurso aos visitantes alternativo ao pólen. Foram coletadas e armazenadas em solução de FAA 70% doze flores em diferentes horas do dia (06 ~ 16h, sendo duas flores por horário em um intervalo de 2h) com a finalidade de verificar, em laboratório, a viabilidade polínica da espécie em questão. Os grãos de pólen foram corados com solução de carmim acético 1%, sendo contabilizados 200 grãos por estames em duas flores nos primeiros horários do dia, com o auxílio do microscópio óptico (KEARNS & INOUE, 1993), foram considerados viáveis apenas os grãos com seu citoplasma corado; os grãos com má formação ou não corados foram considerados inviáveis.

## Sistema reprodutivo

Foram realizadas polinizações controladas em 232 flores distribuídas não homogeneamente em 33 indivíduos marcados *in situ* (RADFORD, 1974). As polinizações realizadas foram: i) apomixia, realizando a emasculação de botões em pré-antese; ii) Polinização cruzada, impregnando o estigma de uma flor com pólen de outro indivíduo; iii) Autopolinização espontânea, isolando a flor sem tratamento prévio; iv) Autopolinização manual, depositando no estigma o pólen proveniente da própria flor; v) Controle, flor sem tratamento, observando o processo de formação dos frutos sob condições naturais (RADFORD, 1974). Todos os tratamentos foram marcados e, com exceção do tratamento controle, isolados em sacos confeccionados com *voile* na fase de botões florais. Os tratamentos foram acompanhados durante um mês para verificação da formação de frutos.

Foi calculado o índice de autocompatibilidade, representado pela razão entre a taxa de frutos formados por autopolinização manual e a taxa de frutos formados no tratamento de polinização cruzada (*ISI*, *sensu* BULLOCK, 1985), sendo resultados acima de 0,25 indicativos de sistemas autocompatíveis. Foi calculada o índice de eficácia reprodutiva (ER), um valor utilizado para estimar a eficácia das polinizações naturais através do cálculo da razão entre a taxa de frutificação do tratamento controle pela taxa de frutos formados por polinização cruzada (ZAPATA & ARROYO, 1978). Foi calculado Índice de Limitação Polínica ( $ILP = 1 - F_C / F_{PC}$ ), onde  $F_C$  e  $F_{PC}$  são as taxas dos frutos formados nos tratamentos controle e de polinização cruzada, respectivamente. O ILP foi calculado para estimar a taxa de redução no sucesso reprodutivo das plantas em decorrência da deposição insuficiente de pólen ou de pólen inapropriado (LARSON & BARRET, 2000; ASHMAN *et al.* 2004; KNIGHT *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2010); conforme Freitas (2010), para valores de  $ILP \leq 2,0$  foi considerada a ausência de limitação polínica e de extrema limitação polínica valores de  $ILP > 8,0$ .

Para verificar a efetividade no desenvolvimento dos tratamentos foram marcadas quatro flores com tratamentos de polinização cruzada, autopolinização manual e controle com 24 e 48 horas após a polinização. A

finalidade era constatar o crescimento do tubo polínico no estilete através da microscopia de fluorescência. Os estiletos foram diafanizados em solução de hidróxido de sódio contendo hipoclorito de sódio e posteriormente corados com azul de anilina (adaptado de MARTIN, 1959). O sucesso reprodutivo da prole foi avaliado através das sementes formadas em dez frutos selecionados aleatoriamente resultantes das polinizações controladas. Foram contabilizadas e submetidas ao experimento de germinação 500 sementes por tratamento, com fotoperíodo de 12h à temperatura de 25°C e sob mesma condição de umidade. O experimento foi acompanhado por 30 dias, sendo verificado em microscópio estereoscópio a presença de embrião e emissão de radícula das sementes viáveis.

### **Visitantes florais**

Os visitantes florais foram observados em campo por meio de registros focais e fotográficos, sendo verificada a frequência de visitas e comportamento ao longo do período de antese da flor, totalizando 30 horas de observação. Foram coletados com rede entomológica e sacrificados com acetato de etila. Os visitantes foram classificados como polinizadores quando vibravam as anteras para a retirada de pólen e contatavam o estigma simultaneamente (DAFNI, 1992); ou, pilhadores (INOUE, 1980) quando acessavam o pólen, causavam danos ou não as anteras, sem tocar o estigma, não efetivando o processo de polinização. Foram consideradas, considerando o comprimento do corpo, abelhas grandes ( $\geq 10$  mm) e pequenas ( $< 10$  mm). A taxa de visitação foi calculada com base na quantidade de visitas por espécie pelo número de visitas totais. Os insetos coletados foram enviados para identificação por especialistas e depositados no Museu de Entomologia Pe. Jesus S. Moure (DZUP).

### **Análise de dados**

Para explorar os resultados de viabilidade de pólen e polinizações controladas (frutificação, produção e germinação de sementes), os dados foram ajustados a diferentes modelos de acordo com a distribuição das variáveis respostas. As análises foram divididas em dois conjuntos. As diferenças de viabilidade do pólen entre os indivíduos e entre os horários foram analisadas por meio de GLM com distribuição binomial e função de ligação *logit*. No segundo conjunto de análises, foram exploradas as diferenças na frutificação, na produção e germinação de sementes de acordo com os tratamentos e populações de polinização.

Para análise das taxas de frutificação em cada tratamento, foi utilizado um modelo linear generalizado misto (GLMM), assumindo uma distribuição binomial ( $n$  = número de flores e  $p$  = probabilidade de uma flor produzir fruto), função *logit* e o indivíduo como um fator randômico. Para analisar se há produção diferencial de sementes (número de sementes) e para germinação de sementes (taxa de germinação), foi utilizado GLM com distribuição Poisson e binomial, respectivamente.

Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando a plataforma R, versão 3.2.5 e os pacotes *vegan* (OKSANEN *et al.*, 2013), *car* (FOX & WEISBERG, 2011), *lme4* (BATES *et al.*, 2015), e *nlme* (PINHEIRO *et al.*, 2016). Os testes *post-hoc* foram realizados utilizando a função *glht* do pacote *multcomp* (HOTHORN *et al.*, 2016).

### 3. RESULTADOS

#### Biologia floral

*Behuria insignis* floresceu durante o fim de janeiro e todo o mês de fevereiro, com alguns poucos indivíduos florescendo no início do mês de março. As flores desta espécie estão dispostas terminalmente em uma inflorescência tirsóide, geralmente ocorrendo a emissão de uma ou duas flores por inflorescência/dia, sendo raros os indivíduos que emitiam três ou mais flores. Estas apresentam antese diurna com duração de menos de um dia, com o início da abertura da corola às 05h estendendo-se até às 07h (Figura 2B) e

com início do fechamento das pétalas próximo às 16h da tarde. As pétalas se abrem e os estames se distendem, mantendo a abertura das anteras poricidas afastadas do estigma; essa distância vai diminuindo ao longo do dia, culminando com o estigma levemente acima dos poros das anteras no fim da tarde. O estigma apresentou-se receptivo desde o primeiro horário da antese, mantendo-se até o fechamento total das pétalas sobre os verticilos de reprodução. Não foi constatada a presença de odor sensível ao olfato humano, evidenciado pela ausência de atividade enzimática através do teste do vermelho neutro (indicativo de presença de osmóforos). O único recurso ofertado aos visitantes florais foi o pólen, que foi retirado através da vibração das anteras por abelhas especialistas ou por abelhas que as mastigavam para ter acesso ao recurso. A viabilidade polínica média foi de  $96\% \pm 1,23$ , variando entre os horários ( $X^2 = 13,428$ ;  $p=0,00025$ ).

### Sistema reprodutivo

Os tratamentos de polinização foram distribuídos de maneira desigual entre os indivíduos em consequência da baixa densidade floral e a emissão de poucas flores por indivíduo/dia (Figura 2D).

**TABELA 1.** RESULTADOS DOS TRATAMENTOS DE POLINIZAÇÃO: FRUTIFICAÇÃO, PRODUÇÃO E GERMINAÇÃO DE SEMENTES EM *Behuria insignis*, NA CIDADE DE ANTONINA, PR, BRASIL.

Tratamento	N	Frutificação	Sementes	
			Produção	Germinação
C	52	50% (26/52)	291,1 $\pm$ 28,96	21,8%
PC	43	72,09% (31/43)	323,1 $\pm$ 47,04	1,8%
AM	56	32,5% (21/56)	257,9 $\pm$ 64,36	5,8%
AE	50	0	0	-
AX	31	0	0	-

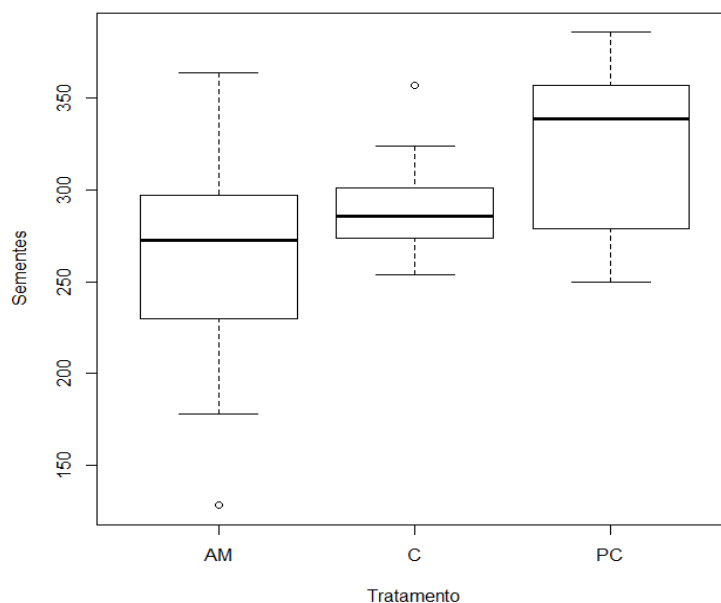
NOTA: Os números relativos à formação de sementes referem-se à média de 10 frutos de um respectivo tratamento. A porcentagem de germinação foi obtida através da germinação de 500 sementes geradas em cada tratamento. Tratamentos: controle (C), polinização manual cruzada (PC), autopolinização manual (AM), autopolinização espontânea (AE) e apomixia (AX).

Houve diferença na formação de frutos entre os tratamentos ( $X^2 = 12,804$ , G.L. = 2;  $p = 0,001658$ ; Tabela 1). Não houve formação de frutos nos

tratamentos de autopolinização espontânea e apomixia, que resultaram na queda total da flor ou apenas do estilete não fecundado um dia após o experimento. Os frutos são capsulares e com seis semanas já estão formados. Entretanto, ainda não estão maduros, não ocorrendo a liberação das sementes durante esse período. A população de *Behuria insignis* estudada mostrou-se autocompatível ( $ISI = 0,52$ ). A eficácia reprodutiva para a população estudada foi de 0,69. Foi constatado  $ILP = 0,30$  para a população.

Houve também diferença na produção de sementes entre os tratamentos ( $X^2 = 73,33$ ; G.L. = 2;  $p < 0,01$ ; Gráfico 1). Os frutos formados por polinização cruzada resultaram na maior média de sementes formada por fruto, seguido pelo controle e com a menor média constatada para os frutos formados em autopolinização manual (as médias foram de 323,1; 291,1; e 257,9 sementes/frutos, respectivamente; Tabela 1). Entretanto, o experimento com maior número de sementes germinadas foi controle (109 sementes germinadas - 21,8%), seguida por autopolinização manual (29 sementes germinadas - 5,8%) e com menor taxa de germinação de sementes formadas no tratamento de polinização cruzada (9 sementes germinadas - 1,8%; Tabela 1).

**GRÁFICO 1.** Quantidade de sementes produzidas em cada tratamento. Os valores se referem aos valores observados em 10 frutos.





### Visitantes florais

Durante as observações realizadas foram evidenciadas apenas abelhas como visitantes florais. Todos os indivíduos pertencem à família Apidae, divididos em duas subfamílias: Apinae, representada por seis espécies, e Halictinae com três espécies (Tabela 2).

Das nove espécies observadas, sete delas foram classificadas como polinizadoras. Sendo as espécies *Bombus (Fervidobombus) brasiliensis*, *Bombus (Fervidobombus) morio*, *Euglossa (Glossura) annectans*, *Ariphanarthra palpalis*, *Augochloropsis sp.* consideradas polinizadoras efetivas, pois apresentaram comportamento vibrátil para extração do pólen e tocaram ambos os verticilos de reprodução. Sendo, para este trabalho, essas espécies classificadas como grandes por apresentarem tamanho corpóreo maior que 10 mm. Os polinizadores posicionam-se sobre os poros das anteras no momento da vibração. As abelhas das espécies *Paratetrapedia fervida* e *Augochlora sp.* também retiraram pólen por vibração, mas ambas as espécies vibravam uma ou poucas anteras de uma vez devido ao seu menor tamanho (< 10mm). Por andarem sobre as anteras e eventualmente tocarem o estigma, ambas as espécies foram classificadas como polinizadoras ocasionais.

*Plebeia emerina* e *Trigona spinipes* são abelhas pequenas e em relação às flores de *Behuria insignis* foram denominadas pilhadoras. Ambas as espécies foram observadas mastigando as anteras para retirada de pólen, causando grandes danos às estruturas de reprodução. Algumas flores foram visitadas por mais de um indivíduo de *Trigona spinipes* ao mesmo tempo. As flores visitadas por ambas as espécies não foram visitadas por outras abelhas polinizadoras em potencial, provavelmente devido ao tempo dispendido pelas espécies na extração do pólen (podendo levar algumas horas até a mastigação total das anteras) e a destruição das anteras (Figura 2E). Essas espécies pilhadoras foram observadas apenas a partir da segunda quinzena do mês de fevereiro, interferindo na visita de polinizadores durante esse período.

As espécies polinizadoras com maior efetividade, considerando apenas a taxa de visitação e a classificação como polinizadores efetivos, foram *Bombus (Fervidobombus) brasiliensis* e *Euglossa (Glossura) annectans*,

ambas com taxa de visitação 0,125 das visitas totais. O gênero *Bombus*, representado por das espécies, foi o grupo mais significativo como polinizadores (aproximadamente 0,19 das visitas). A espécie com maior taxa de visitação foi a pilhadora *Trigona spinipes* (0,4375), mostrando a importância da espécie na reprodução de *B. insignis*. Com base no número de visitas registradas durante o período de observações dos visitantes florais foi constatada uma tendência maior de visitas dos polinizadores durante o horário da manhã, entre as 07h ~ 12h (Gráfico 2).

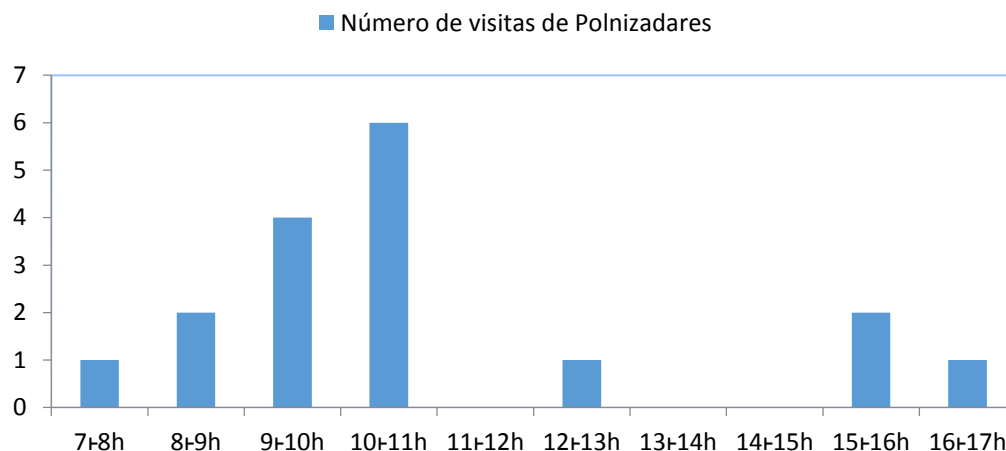
**Tabela 2.** VISITANTES FLORAIS OBSERVADOS EM *Behuria insignis* NA CIDADE DE ANTONINA, PARANÁ, BRASIL.

Visitantes florais	Espécie	Comportamento	Taxa de visitação*
APIDAE			
Apinae			
	<i>Bombus (Fervidobombus) brasiliensis</i> (Lepeletier, 1836)	PE	0,125 (n=4)
	<i>Bombus (Fervidobombus) morio</i> (Swederus, 1787)	PE	0,0625 (n=2)
	<i>Euglossa (Glossura) annectans</i> (Dressler, 1982)	PE	0,125 (n=4)
	<i>Paratetrapedia fervida</i> (Smith, 1879)	PO	0,03125 (n=1)
	<i>Plebeia emerina</i> (Fries, 1900)	PI	0,03125 (n=1)
	<i>Trigona spinipes</i> (Fabricius, 1793)	PI	0,4375 (n=14)
Halictinae			
	<i>Ariphanarthra palpalis</i> (Moure, 1951)	PE	0,0625 (n=2)
	<i>Augochlora sp.</i>	PO	0,0625 (n=2)
	<i>Augochloropsis sp.</i>	PE	0,0625 (n=2)

NOTA: Comportamento: PE – polinizador efetivo, PO – polinizador ocasional e PI – pilhador.  
\*A taxa de visitação foi calculada baseada na razão de número de visitas por espécie pelo número total de visitas.

A deposição do pólen nas abelhas com capacidade vibrátil é ventral, devido à forma como as anteras são abordadas. A posição do estigma mais elevada que as anteras favorece a deposição de pólen exógeno pelos polinizadores.

**GRÁFICO 2.** Distribuição do número de visitas das abelhas polinizadoras ao longo do período de antese.



As abelhas do gênero *Bombus*, após o processo de vibração, agarravam as anteras com as pernas anteriores e ajeitavam o pólen depositado no ventre com o último par de pernas. *Bombus (Fervidobombus) morio* tem um tamanho maior do que as demais e, ao vibrar as anteras, apoiava as pernas posteriores nas pétalas, deixando-as marcadas. *Euglossa (Glossura) annectans* vibrava as anteras (Figura 2G), ajeitava o pólen no ar (em vôo) e voltava à flor, tornando a vibrar as mesmas anteras. Os halictíneos foram observados com frequência vibrando as anteras apoiando-se na região ventral das mesmas na posição invertida (“cabeça para baixo”), fixando-se na base da antera com a mandíbula e o abdome, geralmente, sobre o poro.

Após as visitas, a superfície das anteras apresentavam marcas necróticas deixadas pelas abelhas durante o processo de vibração ou mesmo por se agarrarem às anteras para ajeitarem o pólen (Figura 2H).

#### 4. DISCUSSÃO

A população de *Behuria insignis* estudada apresentou, conforme Gentry (1974), estratégia de floração do tipo *steady state* ou anual intermediária (de um a cinco meses; NEWSTROM *et al.* 1994), com abertura de poucas flores ao dia por um período de aproximadamente dois meses. O autor associou esse tipo de floração à polinização por abelhas que apresentam comportamento de forrageio por meio do estabelecimento de linhas de captura

(*trap-line*), ou seja, são estabelecidas rotas de visitas a indivíduos vegetais dispersos, ocorrendo visitas constantes durante o período de visita, fenômeno observado em *B. insignis* (ver discussão abaixo sobre resultados de frutificação). Esse fator pode estar relacionado a otimização da polinização cruzada, pois a baixa densidade de flores faz com que os polinizadores visitem vários indivíduos floridos para suprir sua necessidade energética (OTÁROLA & ROCCA, 2014).

Assim como verificado para outras espécies da família Melastomataceae, o estigma apresentou-se receptivo logo após a abertura da corola, podendo ocorrer a transferência de pólen logo no início da atividade dos polinizadores (SILVEIRA & FARIA, 2006). Como as flores são hermafroditas, a posição dos órgãos reprodutivos nos horários iniciais da antese demonstra uma hercogamia ocorrente na espécie, podendo estar associada a maior probabilidade de polinização por pólen exógeno, pois diminui as chances de deposição de pólen da mesma flor durante a vibração devido ao primeiro contato do estigma com a região ventral do polinizador impregnado com pólen de outras flores (OLIVEIRA & MARUYAMA, 2014). Essa observação relacionada ao baixo número de flores emitidas por indivíduo/dia pode demonstrar uma menor frequência de geitonogamia para a espécie. A aproximação que ocorre entre as anteras e o estigma com o passar das horas, com diminuição da hercogamia nas flores, pode ser uma importante estratégia para assegurar a reprodução de *B. insignis* por meio da autofecundação.

As flores de *B. insignis* podem ser classificadas como flores de pólen (*sensu* VOGEL, 1978), pois o único recurso nutritivo ofertado aos polinizadores foi o pólen. Podendo ser considerado um recurso atrativo primário aos polinizadores que, por sua vez, realizaram seu transporte de forma ativa. Outra característica que confirma essa classificação floral seriam as anteras (geralmente com deiscência poricida), apresentando contraste com as pétalas; característica que restringe, geralmente, sua polinização à abelhas fêmeas coletoras de pólen. De fato, para *B. insignis*, as anteras poricidas são amarelas e a corola branca, direcionando a atenção dos polinizadores que se utilizam dessas características para se localizar e acessar a fonte do recurso (RENNER, 1989).

Os frutos são capsulares secos e deiscentes com sementes pequenas atingindo cerca de 1,5 ~ 2mm de comprimento (GOLDENBERG, et al. 2016). Frutos secos e deiscentes podem indicar dispersão de suas sementes por meios abióticos (água e vento, por exemplo). As sementes relativamente pequenas de *B. insignis* associadas à deiscência do fruto predizem dispersão autocórica e anemocórica para a população estudada, característica de aproximadamente 40% das espécies de Melastomataceae na porção neotropical (RENNER; 1986).

Como esperado, a população estudada de *B. insignis* demonstrou-se autocompatível e não apomítica, mas dependente de polinizadores. A capacidade de se reproduzir de forma autogâmica parece conferir à *B. insignis* vantagens se analisarmos o fato de sua população na área estudada ser pequena e isolada (obs. pessoal), pois não exige múltiplos indivíduos para colonizar e se dispersar em novos ambientes como as espécies de reprodução estritamente sexuada (SILVERTOWN, 2008). Além disso, esse sistema reprodutivo pode estar associado a uma estratégia de segurança reprodutiva (RICHARDS, 1986; LLOYD 1992), tendo em vista que a abundância e distribuição espacial dos indivíduos vegetais em determinados ambientes são capazes de influenciar a atividade de polinizadores e respectivos sistemas reprodutivos (RAMIREZ, 2010). Em ambientes de altitude espera-se uma menor atividade e densidade de polinizadores devido a condições abióticas do meio, como ventos fortes e baixas temperaturas, resultando na limitação de deposição do pólen (TOTLAND, 1993; BRITO et al. 2012; MAIA, 2017). A riqueza e abundância de polinizadores de *B. insignis* de fato não foram altas, entretanto, a limitação polínica mostrou-se baixa para essa população, que, somado a alta viabilidade do pólen, pode demonstrar que o serviço ecossistêmico prestado pelos polinizadores na região de ocorrência da espécie favorece seu sucesso reprodutivo pela deposição polínica adequada nos estigmas de cada flor. Limitação polínica baixa também foi descrita na literatura para outras espécies de Melastomataceae presentes em Mata Atlântica (FREITAS, 2010). Para o autor, a baixa incidência de plantas autoincompatíveis na família para o referido bioma parece estar relacionada à maior deposição de pólen nos estigmas de plantas nesses ambientes. O maior

resultado de frutificação no tratamento manual de polinização cruzada pode ser associado às rotas de forrageio dos polinizadores e tipo de floração constatado para a espécie.

Em Melastomataceae, a apomixia parece estar associada à baixa ou ausência de viabilidade do pólen, como ocorre em plantas dos gêneros *Leandra* Raddi e *Miconia* Ruiz & Pav. (GOLDENBERG & VARASSIN, 2001; MAIA *et al.* 2016), fenômeno ausente em *B. insignis*, que apresenta alta viabilidade polínica e formação de frutos não apomíticos.

A família Melastomataceae, em geral, produz frutos com muitas sementes (MARTINS, 2009). O mesmo foi constatado para *B. insignis*. Os tubos polínicos, observados por meio de microscopia de epifluorescência, num período de 24h demonstraram que diversos grãos de pólen germinaram no ápice do estigma, sendo que os tratamentos de polinização cruzada e controle apresentaram tubos polínicos quase atingindo o ovário, mas sem o contatar. Nos pistilos tratados e observados em um período de 48h, os tubos polínicos dos tratamentos controle e polinização cruzada penetraram no ovário, o tratamento para autopolinização nesse mesmo período ainda não havia apresentado tubos polínicos penetrando no ovário. Essa velocidade de germinação diferenciada nos tubos polínicos pode apresentar-se como uma estratégia presente para a diminuição da endogamia, favorecendo a fecundação cruzada. O mesmo foi encontrado por Santos *et al.* (2010) para a espécie autocompatível *Miconia angelana* R. Romero & R. Goldenb. ocorrente no Parque Nacional Serra da Canastra, em Minas Gerais. Não foi constatado sítios de autoincompatibilidade que impedissem o crescimento de tubos polínicos.

Embora tenham sido constatados maiores resultados na formação de frutos e sementes no tratamento de polinização cruzada quando comparado aos demais experimentos de polinização, a taxa de germinação das sementes foi a mais baixa entre os três tratamentos. A maior taxa de germinação de sementes formadas por frutos no tratamento controle pode estar associada à ausência da manipulação das flores nesse tratamento, não causando estresse físico capaz de resultar no aborto de sementes. Quando comparadas apenas as taxas de germinação de sementes resultantes de frutos de autopolinização

manual e polinização cruzada manual, uma prole gerada de indivíduos por polinização xenogâmica podem não ser viável devido a fatores como descrito por Ellstrand e Elam (1993), onde a deriva genética e endogamia em pequenas populações são capazes de gerar mudanças na diversidade genética e adaptabilidade dos indivíduos, podendo resultar, entre outros aspectos, na diferenciação genética entre populações ou - pensando na distribuição esparsa de *B. insignis* - indivíduos espacialmente dispersos.

A capacidade de germinação de um número maior de sementes resultantes de autopolinizações também parece garantir a essa população uma quantidade maior de genótipos autocompatíveis, garantido a segurança reprodutiva da espécie nessa área (ver discussão acima sobre autocompatibilidade para *B. insignis*). Entretanto, para testarmos essa hipótese seria necessária a aplicação de outros métodos envolvendo marcadores moleculares, tendo em vista que tais dados coletados em campo podem ter resultado de erros na metodologia aplicada ou nos parâmetros utilizados (luminosidade, temperatura, umidade, etc.) no experimento de germinação em razão da ausência de estudos sobre biologia reprodutiva para o gênero nos quais poderiam ser tomados como base.

As flores de *Behuria insignis* podem ser classificadas como melitófilas (FAEGRI & VAN DER PIJL, 1980) tanto pelos atributos florais quanto pela observação exclusiva de abelhas como visitantes. O resultado negativo dos experimentos de polinização para apomixia e autopolinização espontânea demonstra que a espécie necessita de polinizadores para que haja o fluxo de pólen entre os indivíduos.

Maia (2017) aponta em seu estudo com *Tibouchina hatschbachii* Wurdack (Melastomataceae), espécie sincronopátrica de *Behuria insignis*, que a fenofase de floração na época mais quente do ano (verão), fator que resulta no aumento da disponibilidade e abundância de abelhas (GONÇALVEZ & MELO, 2005; GONÇALVEZ *et al.*, 2009), insetos polinizadores de ambas as espécies. Foram relatadas quinze espécies de abelhas, sendo seis espécies classificadas por ele como polinizadoras e nove pilhadoras de pólen, único recurso ofertado pelas flores de *T. hatschbachii*, sendo retirado das anteras por vibração ou mastigação das mesmas. Assim como registrado para *B. insignis*,

as abelhas do gênero *Bombus* (3 espécies) tiveram maior número de visitas como polinizadoras em *T. hatschbachii*, concordando com dados da literatura que apontam esse grupo com um dos principais clados polinizadores da família Melastomataceae (RENNER, 1989). A maior frequência de visita registrada foi de *Trigona spinipes*, que se comportou como pilhadora dessa espécie. Segundo o autor, a maior taxa de frequência dos visitantes florais na espécie alvo de seu estudo era de abelhas pilhadoras de pólen, o mesmo padrão foi observado para *B. insignis*. O ápice da atividade dos polinizadores foi apontado entre às 07h~10h, padrão de horário semelhante na atividade dos visitantes de *B. insignis*.

Pilhadores podem exercer pressões bióticas nos padrões de produção e dinâmica de remoção do pólen nesses ambientes (MAIA *et al.*, 2017). Por sua vez, a alta viabilidade e disponibilidade do pólen em *T. hatschbachii* é uma forma de compensar a baixa abundância de polinizadores na área, conforme padrão encontrado para a população estudada de *B. insignis*.

As observações realizadas semelhantes entre ambas as espécies ocorrendo na mesma região apontam a importância dos mesmos grupos de visitantes florais para esse ambiente, demonstrando uma guilda de polinizadores das espécies vegetais que necessitem de vibração para a retirada do pólen. Tal fator pode apontar a presença de uma interação ocorrente entre essas espécies vegetais sincronopátricas, tendo em vista que ambas compartilham os mesmos polinizadores em horários semelhantes e florescem na mesma distribuição espacial e temporal. A sincronopatria ocorrente entre as espécies pode resultar na partilha entre polinizadores (o que de fato foi encontrado para *B. insignis* e *T. hatschbachii*) e no fluxo de pólen interespecífico, podendo haver redução do sucesso reprodutivo e perda de pólen pela deposição do mesmo em estigma heteroespecífico (NADIA *et al.*, 2007). Em contrapartida, pode culminar no aumento do sucesso reprodutivo das espécies vegetais devido a maior disponibilidade de recursos, atraindo uma maior diversidade de polinizadores com taxas mais altas de visitas (FRANCO *et al.*, 2011). Baseado no resultado de limitação na deposição de pólen, ambas as espécies não sofrem com a deposição com altos índices de ILP, graças, talvez, a alta produção de pólen viável e visitas efetivas das



abelhas polinizadoras. Sendo assim, a interação entre elas é positiva, podendo existir um mecanismo de facilitação no processo de polinização dessas espécie, contudo, são necessários outros estudos para comprovar essa hipótese.

As abelhas grandes vibravam todas as anteras, enquanto as abelhas menores vibravam uma ou poucas delas por vez. As marcas (necróticas) deixadas pelas abelhas tornava possível observar quais flores haviam sido visitadas (anteras vibradas) e quais ainda estavam intocadas.

Não somente o sistema reprodutivo interfere no estabelecimento de *Behuria insignis* em áreas de altitude. Fatores bióticos e abióticos estão relacionados diretamente na reprodução da espécie. Desde sua densidade populacional à forma como se distribuem os indivíduos em regiões altomontanas, afetando a abundância e atividade dos polinizadores associados ao fluxo de pólen na população, tais fatores refletem nas taxas de produção de frutos e sementes na espécie com ocorrência em regiões isoladas.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Behuria insignis*, baseando-se no presente estudo realizado com a população ocorrente no estado do Paraná, apresenta flores de pólen e melitófilas. Mostrou-se uma espécie com sistema reprodutivo misto, com certo grau de autocompatibilidade, formando frutos e sementes viáveis resultado de polinização com pólen autogâmico.

A autocompatibilidade de *B. insignis* parece facilitar o processo de estabelecimento e dispersão de seus indivíduos na área estudada. Tendo em vista que sistemas reprodutivos autogâmicos não exigem um grande número de indivíduos inter cruzantes para a reprodução facilitando o estabelecimento de espécies autocompatíveis; as flores não apresentaram mecanismos de autoincompatibilidade e as sementes formadas por polinização autogâmica germinaram, com emissão de radícula e cotilédones.

A espécie é totalmente dependente de abelhas especializadas para realizar o fluxo do pólen entre seus indivíduos resultando na formação de frutos e sementes viáveis. Esses polinizadores foram altamente efetivos com base no baixo índice de limitação polínica evidenciado nos indivíduos de *Behuria insignis* estudados e no maior resultado de germinação com polinização realizada apenas pelas abelhas (tratamento controle).

A efetividade e presença de polinizadores e o sistema reprodutivo autocompatível de *Behuria insignis* parece conferir à espécie a capacidade de se estabelecer em um ambiente isolado. É necessária a conservação desse ambiente devido à ocorrência de apenas um registro de *Behuria insignis* para o Paraná e a presença de polinizadores nativos especializados, espécies-chaves para a polinização de outras espécies vegetais locais.

## 6. FIGURAS



**Figura 2** - A. Flor de *B. insignis*. B. Flores de *B. insignis* em antese. C. Frutos em formação. D. Botões florais de *B. insignis* ensacados para experimentos de polinização manual. E. Anteras de *B. insignis* destruídas por pilhadores. F. Indivíduo de *Bombus brasiliensis* ajeitando o pólen. G. Indivíduo de *Euglossa* vibrando anteras para a retirada de pólen. H. Marcas necróticas em anteras de *B. insignis*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEDA F. **A synopsis of the genus *Blakea* (Melastomataceae) in Mexico and Central America**. Novon, v.10, p. 299–319. 2000.
- BACCI, L. F. 2015. ***Miconia* Ruiz & Pav. (Melastomataceae) no estado do Espírito Santo, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba Paraná, Brasil. 2015.
- BACCI L. F., AMORIM A. M., GOLDENBERG R. **Three new species of *Bertolonia* (Melastomataceae) from Espírito Santo, Brazil**. PeerJ 4:e2822. Disponível em: <<https://doi.org/10.7717/peerj.2822>> Acesso em 09 mar. 2017
- BATES, D.; MAECHLER, M.; BOLKER, B.; WALKER, S. **Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4**. Journal of Statistical Software, v. 67, p. 1-48. 2015.
- BAUMGRATZ, J. F. A.; CHIAVEGATTO, B. 2015. *Behuria*. In: Forzza, R.C. et al. (eds.). **Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB9398>> . Acesso em: 25 Set. 2015.
- BOCHORNY, T; MICHELANGELI, F. A. & GOLDENBERG, R. ***Behuria lumiaensis* (Melastomataceae), a new species on a mountaintop of the Brazilian Atlantic Forest**. Phytotaxa, v. 305 (2), p. 111-117. 2017
- BRITO, V. L. G., FENDRICH, T. G., SMIDT, E. C., VARASSIN, I. G. & GOLDENBERG, R. **Shifts from specialised to generalised pollination systems in Miconieae (Melastomataceae) and their relation with anther morphology and seed number**. Plant Biology, v. 18, p. 585–593. 2016.
- BUCHMANN, S. L. **Buzz pollination in angiosperms**. In: Jones, C. E. & Little R. J. (Eds.) Handbook of experimental pollination biology. New York, Van Nostrand. p. 73-113. 1983.
- CAVALLI, S. S. **Apomixia: um método de reprodução assexual**. In. Freitas, LB de; Bered, F. Genética e evolução vegetal. p.41-55. 2003.
- CLAUSING, G. & RENNER, S. S. **Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution**. American Journal of Botany, v. 88, p. 486- 498. 2001.
- CLARK, A. G.; KAO, T-H. Self-incompatibility: theoretical concepts and evolution. In: Williams, EG; Clarke, AE; Knox, BR. **Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants**. ordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 220-244. 1994.

DAFNI, A. **The practical approach series: Pollination Ecology**. IRL Press, Oxford. 1962.

ELLSTRAND, N. C. & ELAM, D. R. **Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation**. Annual Review of Ecology and Systematics, v. 24, p. 217-242. 1993.

FAEGRI, K. & VAN DE PIJL, L. **The Principles of Pollination ecology**. Pergamon Press. Londres. 1979.

FENDRICH, T. G. **A tendência generalista no sistema de polinização em espécies de Miconieae (Melastomataceae) está relacionada a morfometria das anteras e sementes?** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 2012.

FLORA DO BRASIL. **Programa Reflora: Plantas do Brasil: Resgate Histórico e Herbário Virtual para o conhecimento e conservação da flora brasileira**. Disponível em: <  
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do#CondicaoTaxonCP>> Acesso em: 06 mar. 2017.

FOX, J. & WEISBERG, S. **Functions and datasets to accompany**. An R Companion to Applied Regression, Second edition, Thousand Oaks CA: Sage. 2011.

FRACASSO, C. M. & SAZIMA, M. 2004. **Polinização de Cambessedesia hilariana (Kunth) DC (Melastomataceae): sucesso reprodutivo versus diversidade, comportamento e frequência de visita de abelhas**. Revista Brasileira de Botânica, v. 27, p. 797-804. 2004.

FRANCO, A. M.; GOLDENBERG, R. & VARASSIN, I. G. **Pollinator guild organization and its consequences for reproduction in three synchronopatric species of Tibouchina (Melastomataceae)**. Revista Brasileira de Entomologia, v. 55(3), p.381-388. 2011.

FREITAS, L.; WOLOWSKI, M. & SIGILIANO, M. I. **Ocorrência de limitação polínica em plantas de Mata Atlântica**. Oecologia Australis, v. 14(1), p. 251-265. 2010.

FRYXEL, P. **Mode of reproduction of higher plants**. Botanical Review, v. 23, p. 135-233. 1957.

GOLDENBERG, R. 2004. **O gênero Miconia (Melastomataceae) no Estado do Paraná, Brasil**. Acta Botanica Brasilica. v.18 n.4 São Paulo . 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-33062004000400024&lng=pt&nrm=iso&tIng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062004000400024&lng=pt&nrm=iso&tIng=pt)> Acesso em: 06 mar. 2016

GOLDENBERG, R.; ALMEDA F.; CADDADAH M. K.; MARTINS A. B.; MEIRELLES, J.; MICHELANGELI F. A.; WEISS M. **Nomenclator botanicus**

for the neotropical genus *Miconia* (Melastomataceae: Miconieae). Phytotaxa, v.106. 2013.

GOLDENBERG, R.; BACCI, L. F. & BOCHORNY, T. **Behuria, Bertolonia, Cambessedesia, Huberia e Mouriri, e chave para identificação de gêneros de Melastomataceae no Estado do Paraná.** Rodriguésia, v. 67(2), p. 445-454. 2016.

GOLDENBERG, R.; BAUMGRATZ J. F. A. & SOUZA M. L. D. R. **Taxonomia de Melastomataceae no Brasil: retrospectiva, perspectivas e chave de identificação para os gêneros.** Rodriguésia, v. 63, p. 145 – 161. 2012.

GOLDENBERG, R. & SHEPHERD, G. J. **Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in "cerrado" vegetation.** Plant Systematics and Evolution, v. 211, p.13-29. 1998.

GOLDENBERG, R. & VARASSIN, I.G. **Sistemas reprodutivos de espécies de Melastomataceae da Serra do Japi.** Revista Brasileira de Botânica, v. 24, p. 283-288. 2001.

GROSS, C. L. **The breeding system and pollinators of *Melastoma affine* (Melastomataceae), a pioneer shrub in Tropical Australia.** Biotropica, v. 25, p. 468 – 473. 1993.

GUIMARÃES P. J. F. & RANGA N. T. **Sistema de reprodução de *Rhynchanthera dichotoma* (Lam.) DC.** Acta Botanica Brasilica, v. 11, p. 41-44. 1997.

HARTMANN, H.D.; KESTER, D.E. **Propagación de plantas: principios y prácticas.** 4ª edição México: Compañía editorial continental. 1975. 809p.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ - IAPAR. **Cartas climáticas básicas do Estado do Paraná.** Londrina, 1978. 41p.

INOUE, D. W. 1980. **The terminology of floral lacerny.** Ecology. v.61, p. 1251-1253. 1980.

IPARDES. **Zoneamento da Área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba.** Instituto Paranaense de Desenvolvimento Social. Curitiba: IPARDES. 2001. 150 p.

KEARNS, C. A. & INOUE, D. **Techniques for pollinations biologists.** Niwot, Colorado: University press of Colorado. 1993. 579p.

LUMER, C. **Rodent pollination of *Blakea* (Melastomataceae) in a Costa Rican cloud forest.** Brittonia, v.32, p.512–517, 1980.

MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. Livraria José Olympio, Rio de Janeiro. 1981. 442p.

MAIA, F. R. **Influência dos fatores individuais e espaciais no sucesso reprodutivo de *Tibouchina trichopoda* em áreas de regeneração natural de Mata Atlântica**. Trabalho de Monografia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba Paraná, Brasil. 2010.

MAIA, F. R. **Sistemas reprodutivos e visitantes florais em Melastomataceae dos campos rupestres no limite sul do cerrado, Tibagi, Paraná**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 2013.

MAIA, F. R. **O efeito do tempo e espaço na evolução de um táxon restrito aos campos subtropicais da América do Sul**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, São Paulo. 2017.

MAIA, F. R., VARASSIN, I. G., & GOLDENBERG, R.. **Apomixis does not affect visitation to flowers of Melastomataceae, but pollen sterility does**. Plant Biology, v. 18(1), p. 132-138. 2016.

MARTIN, F.N. **Staining and observation pollen tubes in the style by means of fluorescence**. Stain Tech, v. 34, p. 125-128. 1959.

MARTINS, A.B. Melastomataceae. *In*: MARTINS, S. E., WANDERLEY, M. G. L., SHEPHERD, G. J., GIULIETTI, A. M., MELHEM, T. S. (eds.) **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 6, pp: 1-168. 2009.

**MEL names – Classification**. Disponível em:  
<<http://www.melastomataceae.net/MELnames>> Acesso em 05 mar. 2016.

MELO, G. F. A. & MACHADO, I.C.. **Biologia da reprodução de *Henriettea succosa* DC. (Melastomataceae)**. Revista Brasileira de Biologia, v. 56, p.383-389. 1996.

MELO, G. F. A. & MACHADO, I. C. **Auto-incompatibilidade em *Miconia ciliata* (L.C. Rich.) DC. (Miconieae – Melastomataceae)**. Acta Botanica Brasilica, v. 12, p. 113-120. 1998.

MEYER, F. S.; MEIRELLES, J.; CADDAD, M. K. & GOLDENBERG, R. **Novos registros para a família Melastomataceae nos Estados do Paraná e Santa Catarina, Brasil**. Hoehnea, v. 39, p. 339-345. 2012.

MUCHHALA N., JARRIN V. P. **Flower visitation by bats in cloud forests of western Ecuador**. Biotropica, v. 34, p. 387–395. 2002.

NEWSTRON L. E, FRANKIE G. W., BAKER H. G. **A new classification for plant phenology based on flowering patterns in Lowland Tropical Rain Forest Trees at La Selva, Costa Rica**. *Biotropica*, v. 26, p. 141-159. 1994.

OKSANEN, J.; BLANCHET, F. G; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MINCHIN P. R.; O' HARA R. B. **Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-10**. < <http://CRAN.Rproject.org/package=vegan> > Acesso em 15 maio 2017

OLIVEIRA, P. E. & MARUYAMA, P. K. Sistemas reprodutivos. *In*: Rech, A.R.; Agostini, K.; Oliveira, P.E. & Machado, I.C. (org.). **Biologia da Polinização**. p. 71-92.

OTÁROLA, M. F. & ROCCA, M. A. Flores no tempo: a floração como uma fase de fenologia reprodutiva. *In*: Rech, A.R.; Agostini, K.; Oliveira, P.E. & Machado, I.C. (org.). **Biologia da Polinização**. p. 113-126. 2014

PINHEIRO, J.; BATES, D.; DEBROY, S.; SARKAR, D. **nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models**. R package version 3.2.5., p. 1-128. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/web/packages/nlme/index.html>> Acessado em 15 maio 2017

PROCTOR, M.; YEO, R. & LACK, A. **The natural history of pollination**. London, HarperCollins. 1996.

PROENÇA, C.E.B.. **Buzz-pollination - older and more widespread than we think?** *Journal of Tropical Ecology*, v.8, p. 115-120. 1992.

**R – Project for Statical Computing** – Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 15 set. 2016

RADFORD, A.E. **Vascular plant systematic**. Harper & Row Publishers, Inc., New York, p.891. 1974.

RAMÍREZ, N. **Vegetation structure and pollination in the Venezuelan Central Plain**. *Flora*, v. 24, p. 205-229. 2010.

RANIERI, B. D; SILVEIRA, F. A. O. & FRANCESCHINELLI, E. V. **Biologia floral e Comportamento de polinizadores de *Tococa guianensis* Aubl. (Melastomataceae)**. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. *Lundiana*, v. 11(1/2), p.3-8. 2013.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 7ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007. 830p.

RECH, A. R. & WESTERKAMP, C. Biologia da polinização: uma síntese histórica. *In*: Rech, A.R.; Agostini, K.; Oliveira, P.E. & Machado, I.C. (org.). **Biologia da Polinização**. p. 27-43. 2014.



RENNER, S. S. **A survey of reproductive biology in Neotropical Melastomataceae and Memecylaceae.** Annals of the Missouri Botanical Garden, v. 76, p. 496-518. 1989.

RENNER, S. S. **Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae.** Nordic Journal of Botany, v. 13, p. 519-540. 1993.

RENNER, S. S. **The widespread occurrence of anther destruction by Trigona bees in Melastomataceae.** Biotropica, v. 15, p. 251-256. 1983.

RODERJAN, C. V. **O gradiente da Floresta Ombrófila Densa no Morro do Anhangava, Quatro Barras, PR - Aspectos climáticos, pedológicos e fitossociológicos.** Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Paraná. 1994.

ROMERO, R. & MARTINS, A. B. **Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil.** Revista Brasileira de Botânica, v. 25, p. 19-24. 2002.

SANTOS, A. P. M. S., ROMERO, R. & OLIVEIRA, P. E. A. M. O. **Biologia reprodutiva de *Miconia angelana* (Melastomataceae), endêmica da Serra da Canastra, Minas Gerais.** Revista Brasileira de Botânica, v. 33, p. 333-34. 2010.

SANTOS, A. P. **Reproductive biology and species geographical distribution in the Melastomataceae: a survey based on New World taxa.** Annals of Botany, v. 110(3), p. 667–679. 2012.

SILVEIRA, F. A. O. & FARIA, F. S. Some aspects of the floral biology of *Marcetia bahiensis* (Brade & Markgraf) Wurdack (Melastomataceae), in the Chapada Diamantina, Bahia. In: Viana, B. F. & Oliveira, F. F. (Eds.) **Biologia e Ecologia da polinização: Cursos de Campo.** Salvador, EDUFBA. p. 93-100. 2006.

SILVERTOWN, J. **The evolutionary maintenance of sexual reproduction; evidence from ecological distribution of asexual reproduction in clonal plant.** International Journal of Plants Sciences, v. 169, p. 157-168. 2008.

SPECIES LINK. **Projeto Species Link.** < Disponível em: <<http://splink.cria.org.br/>> Acesso em: 06 mar. 2017

TAVARES, R. A. M. **Revisão taxonômica do gênero *Behuria* Cham. (Melastomataceae).** Dissertação de Mestrado. Museu Nacional, UFRJ, Rio de Janeiro. 2005.

TOTLAND, O. **Pollination in alpine Norway: flowering phenology, insect visitors, and visitation rates in two plant communities.** Canadian Journal of Botany, v. 71, p. 1072-1079. 1993.

VARASSIN, I.G., PENNEYS, D.S. & MICHELANGELI, F.A. **Comparative anatomy and morphology of nectar-producing Melastomataceae.** Annals of Botany, v. 102, p. 899–909. 2008.

VALLEJO-MARÍN M., O'BRIEN, H. E. **Correlated evolution of self-incompatibility and clonal reproduction in *Solanum* (Solanaceae).** New Phytologist, v.173, p. 415-421. 2007.

VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal.** Rio de Janeiro: IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 1991. 124 p.

ZAPATA, T.R. & ARROYO, M.T.K. **Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela.** Biotropica, v. 10, p. 221-230. 1978.

ZIEGLER, A. **Beitraege zur Kenntnis des Androeceums und der Samenentwicklung einiger Melastomataceen.** Bot. Arch, v. 9, p. 398-467. 1925.